

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18248

研究課題名（和文）がん由来細胞外小胞が操る自然免疫系制御機構の提唱

研究課題名（英文）Proposing regulatory mechanisms of innate immune system manipulated by cancer-derived extracellular vesicles

研究代表者

辻川 和丈（Kazutake, Tsujikawa）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10207376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自己細胞由来のがん細胞が自然免疫系の細胞機能を操るのか、またその機構があるとしたらどのような機序によりがん細胞自らの生存や増殖を有利にしているのかの問いに挑戦した。その結果、大腸がん細胞は細胞外小胞内にN6メチルアデノシンレベルを低下させたRNAを封入して放出する。そのRNAは単球やマクロファージのTLR8を活性化させ、炎症性サイトカインTNF- α やIL-6を放出させる。それらサイトカインががん細胞の増殖を誘導する。以上の結果は、がん細胞はRNA修飾体バランスを正常細胞と変えてEV内に封入して放出し、自然免疫系を活性化させてがん細胞有意な微小環境へと誘導する機序の存在を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん細胞が細胞外小胞にRNA、特にN6-メチルアデノシン修飾体バランスを変えたtRNA-derived fragment (tDR)を含有させて放出し、あえて単球やマクロファージのパターン認識受容体TLR8に非自己として認識させることにより自然免疫系を活性化させ、サイトカインTNF- α やIL-6の産生をがん細胞有意な微小環境へと誘導する戦略を取っている、というこれまでの学術体系の変革をもたらす研究成果を取得したものである。

研究成果の概要（英文）：This study challenged the question of whether autologous cell-derived cancer cells can manipulate cellular functions of the innate immune system and, if so, by what mechanisms cancer cell survival and proliferation are promoted. We found that colon cancer cells encapsulate and release N6-methyladenosine-deleted RNA in extracellular vesicles. This RNA activated TLR8 in monocytes and macrophages, causing them to release the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. These cytokines promoted cancer cell proliferation. These results provide evidence for the existence of a mechanism by which cancer cells alter the RNA modifier balance with normal cells, encapsulate and release them into the EV, and activate the innate immune system to induce a cancer cell-significant microenvironment.

研究分野：細胞生理学

キーワード：大腸がん 細胞外小胞 RNA脱メチル化 ALKBH5 がん微小環境 TLR8 tRF 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

がん組織においてがん細胞は分化段階の異なる多様な細胞集団から構成されていることが知られている。またがん組織には、これらがん細胞以外に腫瘍関連マクロファージやリンパ球等の免疫担当細胞も存在する。がん細胞は細胞表面分子や放出するサイトカイン等によって免疫細胞の機能を攪乱させ、自らの生存と増殖を確保する機序に関して多くの報告がなされている。またがん細胞は **exosome** と呼ばれる小胞内に **mRNA**、**miRNA** やタンパク質等を含ませて放出し、免疫細胞に取り込ませることによって **exosome** 含有分子が免疫細胞の獲得免疫系機能を制御する機序の存在も示され注目されている。最近、がん細胞は **exosome** 以外にも **large oncosomes**、**microvesicles** や **apoptotic bodies** と呼ばれる多様な大きさや放出機序が異なる小胞を放出していることが示され、**exosome** を含めそれらは総称して細胞外小胞 (**Extracellular Vesicles: EV**) と呼ばれている。そしてがん細胞がどのような分子を含有する **EV** を放出しているか、さらに **EV** が獲得免疫系に対してどのような機能を発現するかの研究が世界中で展開されている。

一方、ヒトは細菌やウイルスの侵入に対する感染防御機構として、**Toll** 様受容体 (**TLR**) による自己と非自己を識別する自然免疫系を構築している。**TLR** は異物をパターン認識するが、その中には 1 本鎖や 2 本鎖の **RNA** を塩基配列や鎖長により認識する受容体が存在する。しかしながら自己細胞由来のがん細胞が自然免疫系を操るのか、またその機構があるのならどのような機序で自らの生存や増殖を有利にしているのかは不明なままであった。

2. 研究の目的

申請者は大腸がん術後検体を用いた解析により、**RNA** の後天的修飾による遺伝子発現変化であるエピトランスクリプトミクスを制御する分子の同定、**RNA** 修飾体の網羅的解析 (エピトランスクリプトーム) の基盤技術構築や、がん組織から **EV** を回収する手法確立により、がん組織由来 **EV** において正常組織と異なるがん特徴的な種類や量の **RNA** 修飾体の存在を認めた。また末梢血単核球にがん組織由来 **EV** を作用させると、正常組織由来 **EV** を作用させた時と比べ顕著に異なる炎症性サイトカイン **TNF- α** や **IL-6** の産生誘導も認めた。それらの知見から、がん細胞は **EV** の **RNA** 修飾体バランスを正常細胞と変えて放出することによりあえて単球や腫瘍関連マクロファージの **TLR** に非自己として認識させ、自然免疫系を活性化する。そして炎症性サイトカイン産生を介してがん細胞有意な微小環境へと誘導する戦略を取っているとの仮説を立てた。本研究は、大腸がんに焦点を当て、大腸がん細胞由来 **EV** のエピトランスクリプトーム解析と単球やマクロファージの **TLR** を介した自然免疫活性化機構解析により、大腸がん細胞は **EV** を使用して炎症応答や大腸がん細胞の生存・増殖を促進するサイトカイン産生を制御していることを、申請者の研究遂行力と大腸がん術後検体、独自基盤技術の活用により開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体

大阪医科薬科大学医学部消化器外科、トランスレーショナルリサーチセンターにおいて、臨床医が患者に研究説明と同意取得の上、試料を取得し、大阪大学に提供したものを使用した。倫理審査承認：(研究課題名) がん臨床検体を用いた創薬研究基盤の構築、(承認番号) 薬人 30-17、(研究期間) 2019 年 1 月 16 日～2027 年 3 月 31 日

(2) 大腸がん術後検体由来がん部、非がん部のエピトランスクリプトーム解析

大腸がんの術後検体のがん部、非がん部を用いて、確立した **EV** 分画法により 200 nm 以上の **large EV** と 200 nm より小さい **small EV** を分画した。これら **EV** の性状解析は **qNANO** により、また **EV** 中の 53 種類の **RNA** 修飾塩基等を **Unispray** を用いた四重極質量分析計 (**TQ-XS**) による独自基盤技術で定量解析した。

(3) がん組織由来 **EV** による単球、マクロファージからのサイトカイン産生制御

ヒト単球細胞株 **THP-1** とマウスマクロファージ細胞株 **RAW264.7** を用いて、**EV** 添加により産生されるサイトカインを **Bio-Plex array** を用いて定量化した。

(4) がん細胞増殖アッセイ

大腸がん細胞を **96 well plate** に播種し、24 時間培養後に検体を添加した。その後 **Cell counting kit 8** を用いて比色定量した。

(5) 次世代シーケンサーを用いた **RNA** 解析

EV から **miRNeasy kit** により **RNA** を抽出精製し、**RNAseq** 用サンプルとした。解析は、大阪大学微生物研究所遺伝情報実験センターゲノム解析室に委託した。**iDEP.91** にて **heatmap** および **hierarchical clustering tree** を作成し、発現プロファイル解析を行った。

(6) 5'-tRF-Gly-GCC *in vitro* 転写

RiboMAX Large Scale RNA Production System-T7 を用いて 5'-tRF-Gly-GCC の *in vitro* 転写を行った。使用した DNA template の配列を以下に示す。

5'-CAGAGATGCATAATACGACTCACTATAGCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCG
CTTGCC-3'

(7) 5'-tRF-GlyGCC qRT-PCR

EV-RNA 10 ng を Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis and qRT-PCR SYBR kits にて

ポリ A 化および cDNA 合成を行った。qRT-PCR は SsoAdvanced SYBR Green Supermix を用いて CFX96 connect Real-time PCR システムにより解析を行った。内部標準には U6 を使用した。Forward primer は 5'-tRF-GlyGCC 5'-GGC AGG CGA GAA TTC TAC CAC TGA ACC ACC AA-3', reverse primer は mRQ3' universal primer を使用した。

(8) Crispr-Cas9 システムによる ALKBH5 ノックアウト細胞の作製

ALKBH5 のガイド RNA と Cas9 発現システムを用いて、大腸がん細胞株 Colon26 の ALKBH5 をノックアウトした。

(9) 5'-tRF-GlyGCC 搭載 EVs (GlyGCC(+) EVs) の調製

Colon26 由来 EVs (1×10^{10} 粒子) に対して、5'-tRF-GlyGCC 転写産物 1 μ g、塩化カルシウム (終濃度 0.1 M) を添加し混合後、30 分間、室温で反応させた。42°C、1 分間ヒートショックをした後、氷上でインキュベートした。RNase で、EVs に搭載されなかった余剰 GlyGCC を分解したのち、10 mM HCl を添加し沈澱を除去し、PBS で洗浄した。

(10) *In vivo* 腫瘍形成促進作用評価

10^6 colon 26 細胞を BALB/c マウスの皮下に移植して腫瘍を形成させ、移植 4 日目から 1 日 1 回 6 日間 EV (4.5×10^8 粒子) を投与した。なお腫瘍体積は (長径 \times 短径 \times 短径) / 2 で計算した。

(11) 統計処理

2 群間の比較は Mann-Whitney test、多重比較検定は 1 way-ANOVA bonferroni's test、1 way-ANOVA bonferroni's test、あるいは Wilcoxon signed-rank test を使用した。なお有意差水準は * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ で表した。

4. 研究成果

大腸がん EV の単球細胞からの TNF- α と IL-6 産生促進作用

大腸がんのがん部、非がん部から EV を精製し、単球様細胞株

THP-1 に添加後、産生するサイトカイン、ケモカイン産生量を合計 68 種検出できるサイトカインアレイ (Bio-Plex array) を用いて解析した。その結果、非がん部大腸由来 EV に比べ、大腸がん EV を作用さ

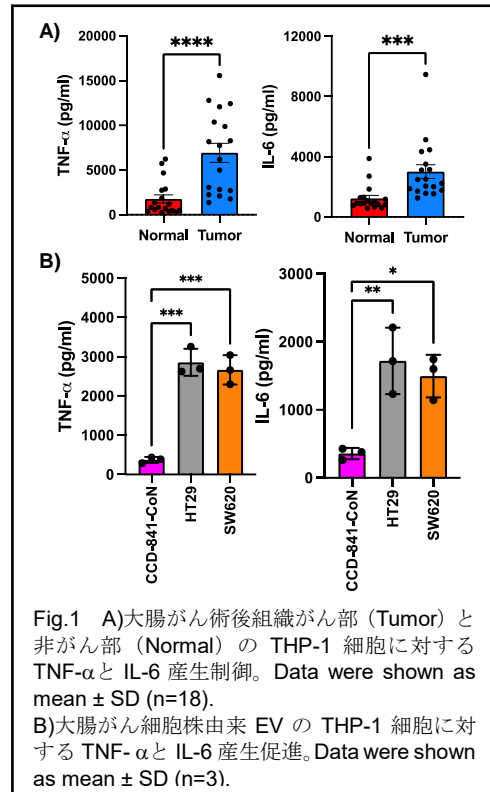


Fig.1 A)大腸がん術後組織がん部 (Tumor) と非がん部 (Normal) の THP-1 細胞に対する TNF- α と IL-6 産生制御。Data were shown as mean \pm SD (n=18). B)大腸がん細胞株由来 EV の THP-1 細胞に対する TNF- α と IL-6 産生促進。Data were shown as mean \pm SD (n=3).

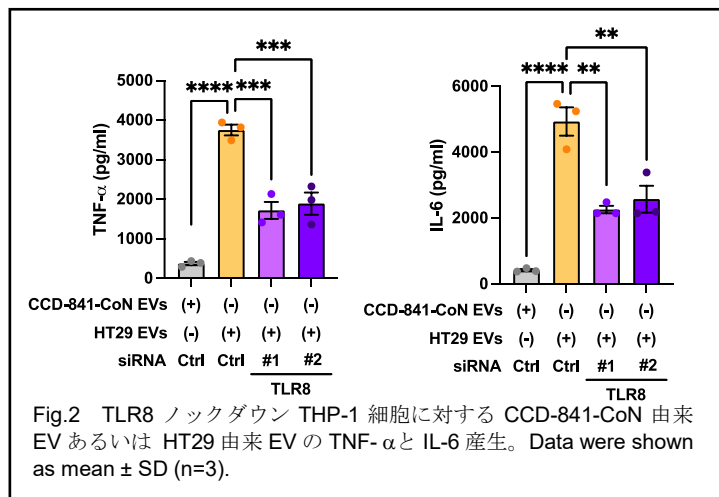


Fig.2 TLR8 ノックダウン THP-1 細胞に対する CCD-841-CoN 由来 EV あるいは HT29 由来 EV の TNF- α と IL-6 産生。Data were shown as mean \pm SD (n=3).

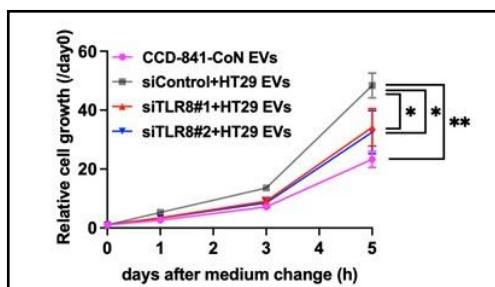


Fig.3 HT29 細胞由来 EV 処理 THP-1 細胞培養上清の増殖促進作用における THP-1 細胞の TLR8 ノックダウンの影響。Data were shown as mean \pm SD (n=3).

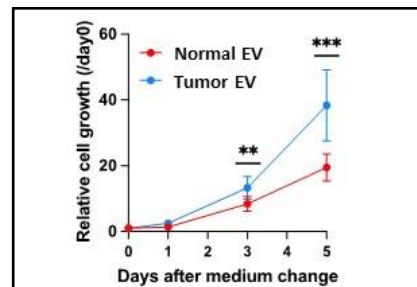


Fig.4 大腸がん術後組織がん部 (Tumor) と非がん部 (Normal) 由来 EV 添加 THP-1 細胞培養上清の大腸がん細胞増殖作用評価。Data were shown as mean \pm SD (n=3).

せた時に有意に発現上昇するサイトカインとして TNF- α と IL-6 が同定された (Fig. 1A)。また正常様大腸細胞株 CCD-841-CoN と大腸がん細胞株 HT29、SW620 由来の EV を用いて比較した結果、同様に大腸がん細胞株由来 EV において、TNF- α と IL-6 の顕著な産生増加が認められた (Fig. 1B)。また同様の作用はマクロファージ様細胞株 RAW264.7 においても認められた (data not shown)。単球は自然免疫において TLR を介して NF- κ B 経路を活性化させ炎症性サイトカインの産生を促進することが知られている。一方、大腸がん EV に内包される RNA 量は、非がん部 EV より多いことを既に突き止めていた。そこでヒトで発現する TLR の中で RNA を認識するファミリーである TLR3、TLR8 に着目し検討を行った。siRNA を用いて THP-1 における TLR8 をノックダウンし、大腸がん細胞株 HT29 由来 EV を作用させたところ、TLR8 ノックダウンにより TNF- α と IL-6 産生促進作用がキャンセルされた (Fig. 2)。またこの作用は抗 TNF- α 抗体と抗 IL-6 抗体で部分的に抑制された (data not shown)。一方で、TLR3 ノックダウン時には有意な変化は見られなかった。以上から大腸がん EV に内包される RNA が TLR8 を介したシグナルにより炎症性サイトカイン産生を促進することが示された。

大腸がん EV 内の RNA (EV-RNA) の単球における TNF- α と IL-6 産生促進作用が明らかになったが、この産生促進作用が大腸がん細胞の増殖に促進的に働かかを検討した。予め正常様大腸細胞 CCD-841-CoN 細胞あるいは大腸がん細胞 HT29 細胞の EV を作用させた THP-1 培養上清を用いて HT29 細胞の増殖能を評価した。その結果、CCD-841-CoN 由来 EV 作用 THP-1 培養上清に比べ、HT29 由来 EV 作用 THP-1 培養上清では、大腸がん細胞の増殖能が有意に亢進された (Fig. 3)。また、その増殖能の亢進は THP-1 の TLR8 ノックダウンによってキャンセルされた。さらに、大腸がん組織由来 EV を用いた検討でも同様の表現型が見られるか検討を行った。その結果、大腸がん組織由来 EV を作用させた THP-1 培養上清は非がん部大腸 EV 作用 THP-1 培養上清に比べ、増殖能を有意に亢進させた (Fig. 4)。このことより、大腸がん EV は単球における炎症性サイトカイン産生促進を介して大腸がんの進展に寄与することが示唆された。

これまでの検討で大腸がん EV-RNA が TLR8 を介して炎症性サイトカイン TNF- α と IL-6 の産生を促進させることを明らかとした。しかし、実際に作用している RNA の種類や特徴は不明であった。そこで非がん部大腸 EV-RNA および大腸がん EV-RNA を精製し、次世代シーケンサーで解析した。その結果、非がん部大腸 EV と大腸がん EV では内包される RNA のプロファイルが大きく異なっており、また内包される RNA 種ごとの割合を見ると非がん部大腸 EV に比べ大腸がん EV で tRNA の占める割合が有意に大きいことが明らかとなった。そこで EV-tRNA に注目しさらなる解析を行った。RNAseq によって検出された tRNA の配列を確かめると全長配列のものではなく、全てが断片化された tRNA Fragment (tRF) であった。今回検出された tRF の 90%以上が 5'末端から D ループまで断片化された 5'-tRF であることが明らかになった。そこで最も量の多い 5'-tRF に注目し、コードされるアンチコドンごとに分類したところ Glycine-GCC (GlyGCC) が大腸がん EV で高発現しており全体の半数を占めていることが認められた。この 5'-tRF-GlyGCC について実際に検出された read 数で比較すると非がん部大腸 EV に比べ、大腸がん EV で有意に read 数が多いことが明らかとなった (Fig. 5)。そこでこの 5'-tRF-GlyGCC に注目し単球に対する表現型との関連を検証することにした。

5'-tRF-Gly-GCC が単球の TLR8 に対して作用するか検討するため、5'-tRF-Gly-GCC を *in vitro* で転写し、その転写産物を THP-1 に導入したところ、TNF- α と IL-6 の産生量が有意に増加した (Fig. 6)。また、THP-1 における TLR8 ノックダウンによりこれらの表現型はキャンセルされた。このことから、大腸がん EV に内包される 5'-tRF-Gly-GCC は単球やマクロファージ等の自然免疫に機能する細胞の

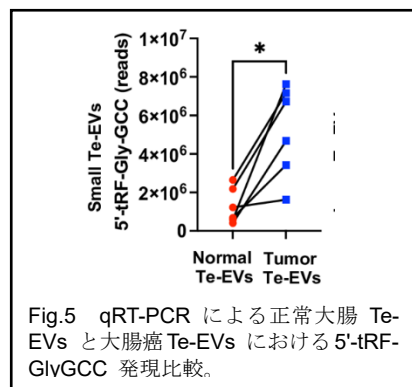


Fig.5 qRT-PCR による正常大腸 Te-EVs と大腸癌 Te-EVs における 5'-tRF-GlyGCC 発現比較。

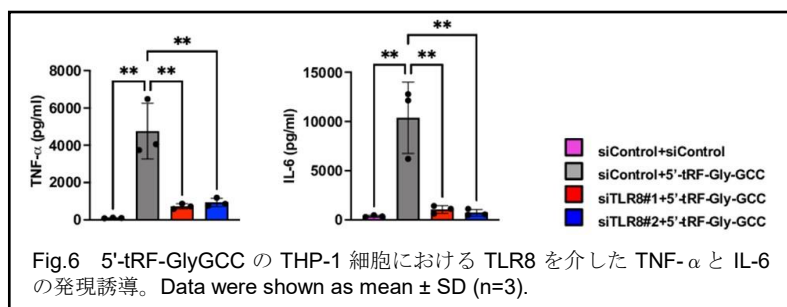


Fig.6 5'-tRF-GlyGCC の THP-1 細胞における TLR8 を介した TNF- α と IL-6 の発現誘導。Data were shown as mean \pm SD (n=3).

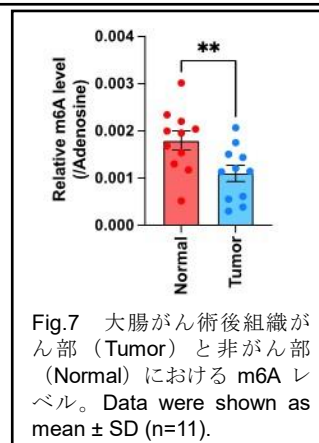


Fig.7 大腸がん術後組織が がん部 (Tumor) と非がん部 (Normal) における m6A レベル。Data were shown as mean \pm SD (n=11).

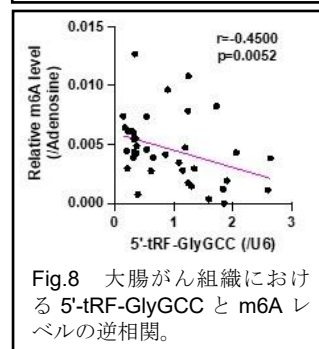


Fig.8 大腸がん組織における 5'-tRF-GlyGCC と m6A レベルの逆相関。

TLR8 を介して炎症性サイトカイン産生を促進していることが明らかとなった。

次に、大腸がん EV に内包される 5'-tRF-GlyGCC における RNA 修飾レベルが TLR8 への応答性を制御している可能性を考え検証した。まず、EV に内包される RNA 修飾体を解析し、大腸がん EVs の 5'-tRF-GlyGCC の内包量や表現型と相関の見られる RNA 修飾体として、N6-methyladenosine (m6A) を同定した。m6A レベルは非がん部大腸 EV に比べて大腸がん部 EV で減少しており (Fig. 7)、かつ m6A と内包 5'-tRF-GlyGCC 量と負の相関が見られることがわかった (Fig. 8)。また m6A の脱修飾酵素として知られている ALKBH5 に着目し、Crispr-Cas9 システムにより大腸がん細胞 Colon26 の ALKBH5 をノックアウトさせ、放出する EV を用いて評価した。その結果、ALKBH5 のノックアウト EV によりマクロファージ RAW264.7 からの TNF- α と IL-6 産生が有意に抑制されることが分かった (Fig. 8)。この結果は、ALKBH5 のノックアウトにより EV 中の m6A レベルが上昇し、炎症性サイトカインの産生が抑制されたものと考えられた。

最後に、大腸がん 5'-tRF-GlyGCC EV の腫瘍形成促進作用を評価した。マウス大腸がん細胞 colon26 のマウス皮下移植モデルに対して、5'-tRF-GlyGCC をトランスフェクションした colon26 の EV を腫瘍の周りに投与した。

その結果、コントロール EV 投与群と比べて大腸がん 5'-tRF-GlyGCC EV を投与した群において有意な腫瘍形成促進作用が認められた。

以上より、大腸がんは ALKBH5 により m6A を脱メチル化させた 5'-tRF-GlyGCC を EV に含有して放出する。その EV は腫瘍微小環境の腫瘍関連マクロファージに対して炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 の産生を TLR8 のシグナル伝達により促進させる。それらのサイトカインが腫瘍細胞に対して増殖促進効果を誘導する機序の存在が示された。

本研究により、がん細胞は特徴的な RNA 修飾レベルを低下させた tRF 含有 EV の放出により、自然免疫系を制御してがん細胞の増殖や生存性を有意にさせる機序の存在を示すことができた。

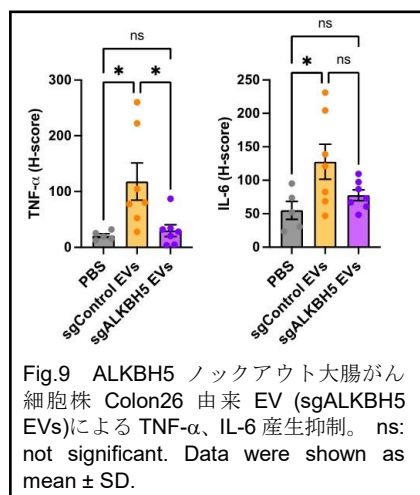


Fig.9 ALKBH5 ノックアウト大腸がん細胞株 Colon26 由来 EV (sgALKBH5 EVs)による TNF- α 、IL-6 産生抑制。ns: not significant. Data were shown as mean \pm SD.

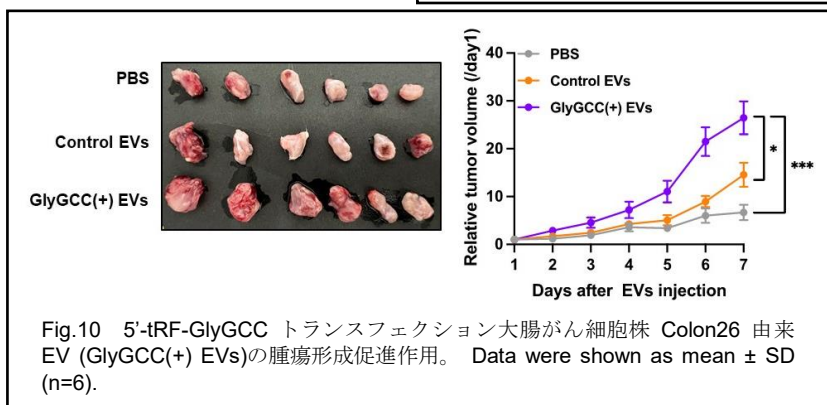


Fig.10 5'-tRF-GlyGCC トランスフェクション大腸がん細胞株 Colon26 由来 EV (GlyGCC(+) EVs)の腫瘍形成促進作用。Data were shown as mean \pm SD (n=6).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuya Monoe, Kentaro Jingushi, Yoshiaki Takano, Kohei Taniguchi, Kazumasa Komura, Kazutake Tsujikawa
2. 発表標題 Colorectal cancer-derived Te-EVs function as tumor promoter by targeting monocytes via EVs-tRNA
3. 学会等名 ISEV2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 物江 祐弥, 神宮司 健太郎, 宮本 瞬輔, 谷口 高平, 小村 和正, 辻川 和丈
2. 発表標題 卵巣癌においてRNA修飾は癌微小環境によって制御される
3. 学会等名 物江 祐弥, 神宮司 健太郎, 宮本 瞬輔, 谷口 高平, 小村 和正, 辻川 和丈
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 物江 祐弥, 神宮司 健太郎, 内藤 拓也, 高野 義章, 谷口 高平, 小村 和正, 長谷 拓明, 辻川 和丈
2. 発表標題 大腸癌放出細胞外小胞に内包されるsmall RNAは単球におけるToll-like Receptor 8を介して腫瘍促進的に働く
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 物江 祐弥, 神宮司 健太郎, 高野 義章, 谷口 高平, 小村 和正, 長谷 拓明, 辻川 和丈
2. 発表標題 大腸癌組織より放出される細胞外小胞は内包RNAを介して腫瘍促進性に働く
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Monoe, Kentaro Jingushi, Yoshiaki Takano, Kohei Taniguchi, Kazumasa Komura, Kazutake Tsujikawa
2. 発表標題 Low m6A level of 5' tRF-GlyGCC in colorectal cancer derived-EVs promotes tumorigenesis via TLR8 in a macrophage
3. 学会等名 ISEV2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Monoe, Kentaro Jingushi, Yoshiaki Takano, Kohei Taniguchi, Kazumasa Komura, Kazutake Tsujikawa
2. 発表標題 N6-methyladenosine determines the tumor-promoting effect of 5' tRF-GlyGCC in colorectal cancer EVs
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 物江祐弥, 神宮司健太郎, 高野義彰, 李相雄, 谷口高平, 小村和正, 辻川和丈
2. 発表標題 大腸癌EVs-RNAにおけるm6A修飾レベルの低下は自然免疫応答を撓乱し腫瘍促進的に働く
3. 学会等名 第10回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学薬学研究科 細胞生理学分野ホームページへようこそ https://sites.google.com/site/xibaoshengli/ 大阪大学薬学研究科細胞生理学分野 学会発表 2021年度 https://sites.google.com/d/11qnyQHPGADhyDPCv31eaILLPheChxv6f/p/1u0Z4yLKlhz3e6pmjpVYxWlXymUI5T4qkL/edit 博士後期課程2年物江祐弥君が第10回日本細胞外小胞学会学術集會にて奨励賞を受賞しました(10月) https://sites.google.com/site/xibaoshengli/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	谷口 弘平 (Taniguchi Kohei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関